

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN
FERMENTATIVEN ABBAU VON E 600,
METHYL-E 600, E 605 UND METHYL-E 605
IM MENSCHLICHEN SERUM

von

Heinz-Johann Burgis
aus Burgellern/Bamberg



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Prof. Dr. Dr. E. Weinig

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN
FERMENTATIVEN ABBAU VON E 600,
METHYL-E 600, E 605 UND METHYL-E 605
IM MENSCHLICHEN SERUM

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

vorgelegt von
Heinz-Johann Burgis
aus Burgellern/Bamberg



Dekan : Prof. Dr.Dr. H. Pauly

Referent : Prof. Dr.Dr. M. Geldmacher-v.Mallinckrodt

Koreferent : Prof. Dr.Dr. E. Weinig

Tag der mündlichen Prüfung : 18. 9. 1972

Inhaltsverzeichnis

	Seite
A) Einleitung	1
B) Literaturüberblick zum Thema	6
C) Beschreibung des verwendeten Materials und der angewandten Methodik	19
D) Eigene Untersuchungen Ergebnisse und statistische Auswertung	33
E) Diskussion und Zusammenfassung	63
F) Literatur	69

A) Einleitung

Die Entwicklung der Organophosphorverbindungen erstreckt sich über einen Zeitraum von mehr als 100 Jahren. Thenard stellte 1847 mehrere Phosphine her, die aber nicht näher untersucht wurden. Eine systematische Erforschung der Organophosphorverbindungen begann erst mit den Arbeiten von Michaelis. Er hat in 4 Jahrzehnten die wissenschaftliche Grundlage zur Herstellung solcher Phosphorverbindungen gelegt, die am Zentralatom Phosphor eine Stickstoff-, Sauerstoff-, Schwefel-, Selen-, oder Kohlenstoffbindung aufweisen. 1904 erschienen erste Arbeiten über Organophosphorverbindungen von russischer Seite durch Arbusow.

Mitte 1930 beginnt eine dritte Periode mit einer ungeheuren Anzahl neuer Arbeiten auf dem Gebiete der organischen Phosphorverbindungen. Organophosphorverbindungen wurden als Weichmacher für Kunststoffe, als Extraktionsmittel, als Oxydationsinhibitoren für Schmieröle usw. eingesetzt. Als interessanteste Anwendungsmöglichkeit wurde aber die biologische Wirksamkeit bestimmter Phosphorverbindungen in der Humanmedizin und der Schädlingsbekämpfung erkannt.

Die ungemein wertvollen insektiziden Eigenschaften dieser Verbindungen sind vom Arbeitskreis um Schrader aufgedeckt worden. Schrader darf auch als Entdecker der praktisch wichtigsten Vertreter dieser Stoffklasse bezeichnet werden.

Der Wirkungsmechanismus dieser Stoffgruppe wurde durch Groß aufgeklärt. Er stellte fest, daß die Phosphorsäureester die Cholinesterasen stark hemmen, also ähnliche Wirkungen zeigen, wie dies für die Physostigmingruppe bekannt ist. Die Entdeckung der starken Cholinesterasehemmung durch bestimmte Alkylphosphate hat sich bei der Bearbeitung physiologischer Fragestellungen, insbesondere bei der Erforschung der Rolle des Acetylcholins und der Cholinesterasen in der Nervenphysiologie, als außerordentlich fruchtbar erwiesen.

In der Literatur wird vielfach unterschieden zwischen "Pseudocholinesterase", die im Plasma von Mensch, Pferd und anderen Tieren vorkommt, und der wahren "Cholinesterase", die vorzugsweise an den Erythrozyten, im Gehirn und anderen Geweben gefunden wird. Die Pseudocholinesterase, E.C.3.1.1.8, deren physiologische Rolle noch nicht völlig abgeklärt ist, spaltet ganz allgemein Carboxylester, darunter auch Cholinester, mit einem Spaltungsoptimum bei den Butyraten und besonderer Wirksamkeit bei hohen Cholinesterasekonzentrationen. Die "wahre" Cholinesterase, E.C.3.1.1.7, hat ihr Spaltungsoptimum bei den Acetaten und ist auch bei schwachen AcetylcholinKonzentrationen sehr wirksam.

Bei Hemmung der Cholinesterase kommt es an den nervösen Endapparaten zur Anhäufung von Acetylcholin. Die Vergiftungssymptome dürfen somit weitgehend als Auswirkung der

unphysiologisch starken Reizung der Erfolgsorgane durch Acetylcholin angesehen werden.

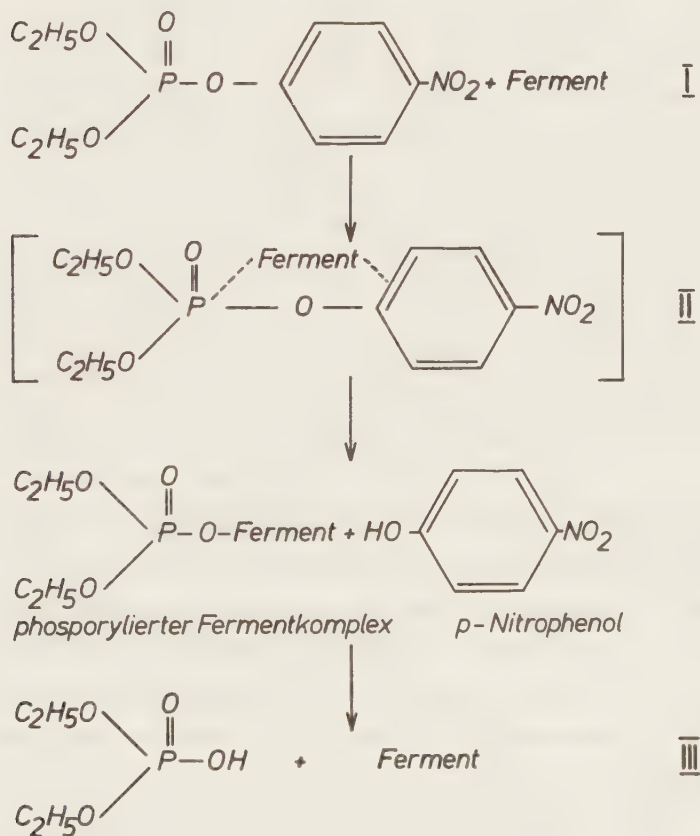


Abbildung 1

In der Abbildung 1 wird die Einwirkung eines Phosphorsäureesters (E 600) auf die Cholinesterase schematisch dargestellt.

Dabei zeigt R e a k t i o n I die Anlagerung des P-Esters an das Ferment, R e a k t i o n II die Abspaltung von Nitrophenol und die Blockierung des Fermentes durch Phosphorylierung. Beide Reaktionen verlaufen schnell. Die Phosphorylierung des Fermentes geht nur über die vorangegangene Blockierung des Enzymes durch den Triester. Weder die Diäthyl- noch die Diäthylthiophosphorsäure allein vermögen mit Cholinesterase zu reagieren. Beide Substanzen sind physiologisch unwirksam. Die Abspaltung des phosphorhaltigen Insektizidrestes, R e a k t i o n III, verläuft so langsam, daß man die Fermentblockierung lange Zeit für irreversibel hielt, im Gegensatz zur Fermenthemmung durch Stoffe der Physostigmingruppe, bei welcher die Reaktivierung des Fermentes wesentlich schneller erfolgt. Man hat daher Physostigmin als sogenannten reversiblen Cholinesterasehemmstoff den P-Estern gegenübergestellt. Es bestehen in dieser Hinsicht jedoch nur quantitative Unterschiede, zumal nachgewiesen wurde, daß die Abspaltung des phosphorhaltigen Restes in vitro nicht nur durch Dialyse, sondern auch durch Zusatz bestimmter Stoffe, wie Cholin und Hydroxylamin beschleunigt werden kann.

Man nimmt an, daß der P-Ester an die gleichen spezifischen Orte im Ferment tritt wie Acetylcholin. Dabei hängt die starke biologische Wirkung der phosphororganischen Verbindungen damit zusammen, daß das spezifische Enzym (Cholinesterase) nur in relativ geringem Überschuß im Organismus vorhanden ist.

Besonders das Zentralnervensystem benötigt aber eine hohe Rate an aktiver Cholinesterase.

Zwischen den einzelnen P-Estern bestehen in ihrer Cholinesterasehemmwirkung erhebliche quantitative Unterschiede. E 600 (O,O-Diäthyl-O-p-Nitrophenyl-Phosphat) zum Beispiel ist ein starker Hemmstoff, E 605 (O,O-Diäthyl-O-p-Nitrophenyl-Thiophosphat) besitzt in technischen Präparaten in vitro ebenfalls eine ausgeprägte Hemmwirkung, dagegen ist die Hemmung bei Verwendung eines chromatographisch gereinigten Produktes relativ gering. Es ist nachgewiesen worden, daß der Thiophosphorsäureester in E 600 umgewandelt wird. Derartige Konvertierungen treten auch bei anderen Phosphorsäureestern auf.

Über die Ausscheidung der Insektizide liegen zahlreiche Untersuchungen vor. Nach radioaktiver Markierung von E 605 zeigte sich bei Versuchen mit Kaninchen, daß nach 24 Stunden der weitaus größte Teil der Aktivität über die Niere ausgeschieden worden war. Die Ausscheidung über die Faeces trat auch bei per oraler Applikation weit zurück, ein Zeichen für die ungewöhnlich gute Resorption der Ester aus dem Magen-Darm-Trakt. Die Ausscheidungsprodukte in Harn und Faeces hatten ihre Toxizität eingebüßt, es hatte eine Spaltung im Organismus stattgefunden.

B) Literaturüberblick zum Thema

Aldridge (1953 a) untersuchte Serumesterasen bei Kaninchen Ratte und Pferd. Er fand dabei 2 Typen von Esterasen, die er nach ihrer Hemmbarkeit durch E 600 in A- und B-Esterase einteilte. Die A-Esterasen werden durch E 600 nicht gehemmt, die B-Esterasen werden durch E 600 in einer Konzentration von 10^{-7} bis 10^{-8} M gehemmt.

Bei der Untersuchung verschiedener Tierspezies verlief der Nachweis der A-Esterase mit einer Ausnahme, dem Serum der Ente, in 13 Spezies positiv. Auch im menschlichen Serum wurde diese A-Esterase nachgewiesen. Paraoxon war für diese Zwecke ein außerordentlich gut geeigneter Hemmstoff. Er war leicht rein darzustellen, relativ stabil gegen hydrolytische Einflüsse und sehr aktiv. Aldridge stellte in seiner Arbeit aber auch fest, daß die relativen Aktivitäten der A- und B-Esterasen innerhalb einer Spezies von Tier zu Tier unterschiedlich sind.

In einer weiteren Veröffentlichung beobachtete Aldridge (1953 b), daß bei der Zugabe von E 600-Lösung zu Kaninchenserum eine Gelbfärbung auftritt. Diese Färbung wird durch p- Nitrophenol aus der Spaltung des Paraoxon verursacht. Aldridge zeigte auf, daß das E 600-spaltende Ferment und die früher beschriebene A-Esterase identisch sind. Weiterhin bewies er die enzymatische Natur der Spaltung, denn die Hydrolyse des Paraoxon erwies sich als kontinuierlich, die Werte lagen wesentlich höher als die

der gleichzeitig ablaufenden einfachen hydrolytischen Spaltung, die Werte der Enzymaktivität verliefen proportional mit der Serumkonzentration. Bei 5-minütigem Erhitzen auf 68 °C ging die Enzymaktivität verloren.

Das Enzym wurde E 600-Esterase genannt und war, wie ebenfalls im Verlauf der Arbeit gezeigt wurde, mit der sauren und alkalischen Serumphosphatase nicht identisch.

Unter den geprüften Seren war das Kaninchenserum, wie Abbildung 2 zeigt, am aktivsten.

Eine Variation einer Enzymaktivität innerhalb verschiedener Spezies zeigte sich aber auch schon bei Untersuchungen anderer Fermente zB. der Cholinesterase im menschlichen Serum und im Serum verschiedener Tierarten. Solche Unterschiede in den Proteinen sind bei verschiedenen Spezies zu erwarten.

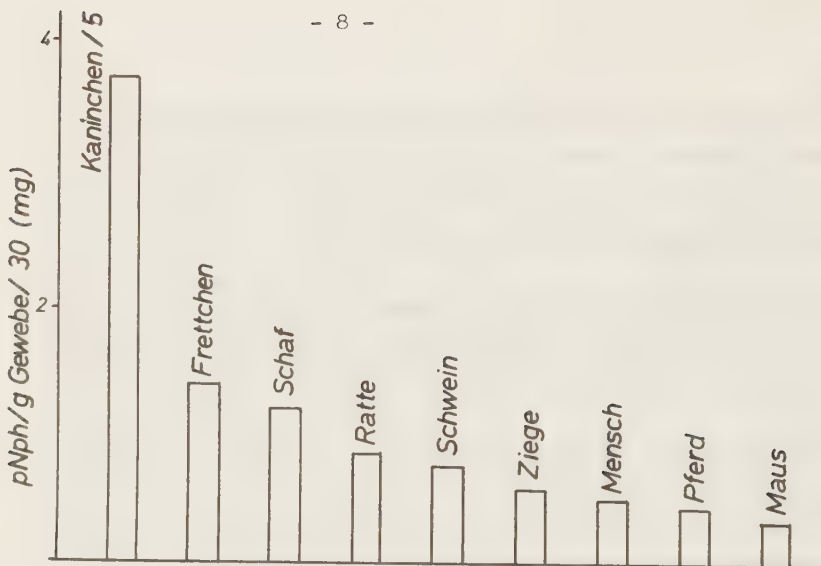


Abbildung 2

E 600-Esteraseaktivität im Serum verschiedener Tierspezies und des Menschen. Für die Aktivität des Kaninchenserums ist nur $1/5$ des Wertes aufgetragen.

Über die Organherkunft der sogenannten A-Esterase im menschlichen Serum ist wenig bekannt. Beim Kaninchen liegen dagegen hierüber einige Befunde vor. Hohe Aktivitäten finden sich im Serum, in Leber, Herz, Niere, Milz und Skelettmuskel. Hiernach handelt es sich um ein wenig organspezifisches, weitverbreitetes Enzym.

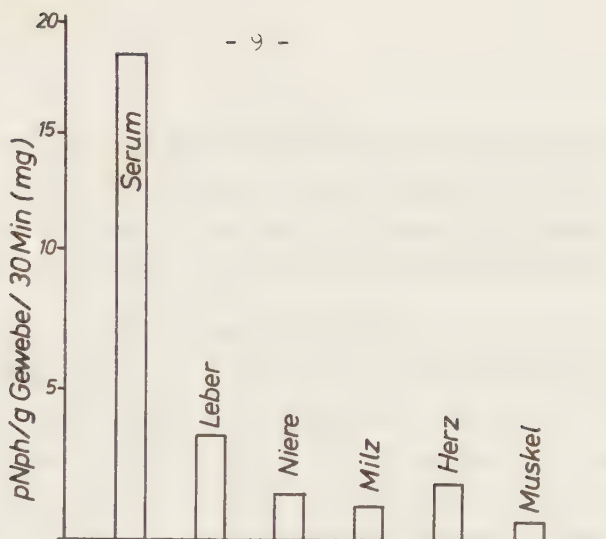


Abbildung 3

E 600-Aktivität in verschiedenen Geweben des Kaninchens

Augustinsson und Heimbürger(1954) berichten über die enzymatische Hydrolyse von Organophosphorverbindungen im Blutplasma, welche die Werte der Hydrolysereaktion in Lösungen ohne Plasma weit übertrifft. Die Reaktion fiel nach 10-minütigem Erhitzen auf 70°C aus. Nach 24-stündiger Dialyse gegen strömendes Wasser betrug die Aktivität nur noch wenige Prozent, was dafür spricht, daß es sich um eine enzymatische Reaktion handelte. Die Autoren benannten das Ferment mit "Phosphoryl-Phosphatase" und unterstreichen, daß es nicht den gewöhnlichen Phosphatasen zuzurechnen ist.

Als Enzymquellen benutzten sie Plasma von 7 verschiedenen Tierspezies und menschliches Plasma. Dabei verlief der Nachweis im Plasma der Kuh, von der bekannt ist, daß sie keine Cholinesteraseaktivität besitzt, ebenfalls positiv.

Für unterschiedlich hohe Plasmakonzentrationen und Hydrolysewerte ergab sich ein direkt proportionales Verhalten. Die Autoren stellen insbesondere die Bedeutung des Enzyms heraus, welches durch seine Anwesenheit die Inaktivierung der Cholinesterase durch Organophosphorverbindungen wesentlich mindert, indem es offensichtlich in den Entgiftungsmechanismus eingreift.

In einer 1955 veröffentlichten Arbeit untersuchen Augustinsson und Heimbürger die Wirkung der "Phosphorylphosphatase" auf Cholinesterase, welche durch Organophosphorverbindungen inaktiviert worden war. Die verwendeten Verbindungen waren Tabun, DFP, TEPP und E 600. Die Enzymaktivität wurde nach der Warburg-Methode gemessen. Die Ergebnisse legten die Vorstellung nahe, daß die Phosphorylphosphatase die inaktivierte Cholinesterase reaktivieren kann. Eine genauere Untersuchung der Phänomene zeigte, daß kein wirklicher reaktivierender Effekt vorlag, sondern daß die Phosphatase die fortschreitende Inaktivierung hemmte.

Es wird der im folgenden Schema aufgezeigte Reaktionsmechanismus angenommen:

Das Enzym verbindet sich reversibel mit der Phosphorverbindung , dann reagiert die Säuregruppe des Phosphor-enthaltenden Anteils des Komplexes mit dem H-Atom des Enzymmoleküls , die betreffende Säuregruppe freisetzend.

Die Phosphorylphosphatase soll Reaktion (2) und (3) daran hindern abzulaufen. Der P-enthaltende Anteil des Komplexes (Reaktion 1) wird dabei hydrolytisch gespalten , die Säure und eine Phosphorsäure werden freigesetzt, die Cholinesterase wird aktiv.

Der Wirkungsgrad der Phosphatase hängt von der abgelaufenen Kontaktzeit zwischen der Cholinesterase und der P-Verbindung ab,sowie von den verschiedenen Gruppen (Alkyl- , Amidogruppe , usw.) am Phosphorhemmstoff.

Friedberg und Erdmann (1959) beobachteten ,daß nach längerer Lagerung von Paraoxon- und Parathion-vergifteten Tierkadavern in den Bluthomogenaten sehr viel höhere Esteraseaktivitäten gemessen werden konnten ,als unmittelbar nach dem Tode.Es mußte zu einer spontanen Reaktivierung gekommen sein,obwohl bisher die Auffassung vertreten worden war,daß die Fermentblockade durch organische Phosphorsäureester nicht reversibel sei.Auch im inVitro-Versuch mit Pferdeserum wiesen die Autoren eine spontane Reaktivierung nach Paraoxonvergiftung nach.Blockierte Cholinesterase erholte sich zum Beispiel in einer Beobachtungszeit von 15 Tagen auf 70% der Normalaktivität.Auf entsprechende Versuche mit Parathion wurde verzichtet,da dieses in vitro keine und in vivo nur nach Konversion in sein biologisches Oxydationsprodukt Paraoxon deutliche Hemmwirkung auf die Esterase besitzt.

Bei Zugabe überschüssiger Mengen von Paraoxon konnte nach 24 Stunden praktisch nichts mehr von dem Cholinesterase-hemmenden Stoff nachgewiesen werden.Die möglichen Erklärungen ,daß eine starke Flüchtigkeit oder eine von Haus aus hohe Hydrolysegeschwindigkeit des Paraoxon der Grund für dieses Phänomen sein könnte,wurde experimentell ebenso widerlegt,wie die Möglichkeit,daß Paraoxon durch Cholinesterase schnell verbraucht werden könnte. Für die letztere Versuchsreihe wurde Rinderserum verwandt,welches keine Cholinesterase enthält.

Als Erklärung bot sich ein im Serum existierendes Ferment an,

welches relativ schnell Paraoxon zu spalten vermag. Auf Grund ihrer experimentellen Ergebnisse machten die Autoren die bereits von Augustinsson und Heimbürger (1954) beschriebene " Phosphorylphosphatase " verantwortlich.

Main (1960) versuchte das Paraoxon-hydrolysierende Enzym aus Schafsserum rein darzustellen. Es gelang ihm nach mehrfachen Reinigungsvorgängen mit Hilfe der Elektrophorese ein 80%-95% ig reines Enzym zu gewinnen, dessen Molekulargewicht mit 35 000 - 50 000 angegeben wird.

Schaumann und Schiller (1960) untersuchten durch in vitro Versuche mit den Seren weißer Mäuse die Inaktivierung von Cholinesterasehemmstoffen. Sie machten dafür zwei voneinander unabhängige Vorgänge verantwortlich : Eine Adsorption an das Serum und eine enzymatische Zerstörung.

Erdös und Boggs bestätigten in einer 1961 veröffentlichten Arbeit eine aus früheren Untersuchungen abgeleitete Vermutung, daß mehrere Faktoren bei der Hydrolyse von Paraoxon im menschlichen Serum zusammenwirken. Sie fanden , daß die Paraoxon-spaltende Aktivität in der Fraktion IV-1 durch Äthylendiamintetraacetat vollständig gehemmt werden kann, daß aber hiermit nicht die gesamte Aktivität des Nativserums erfaßt ist. Auf der Suche nach der Äthylendiamintetraacetat-resistenten Aktivität entdeckten sie eine E 600-spezifische Enzymak-

tivität im Humanalbumin Fraktion V.

Durch Mischung von Fraktion IV-1 und V konnten sie mit selektiven Inhibitoren Ergebnisse erzielen, welche den mit Serum ermittelten ähnlich waren.

Skrinjarik-Spoljar und Reiner (1968) gingen in ihrer Arbeit davon aus, daß Organophosphorverbindungen im Säugetierserum hydrolytisch gespalten werden, daß dieses spezifische Enzym, welches für die Spaltung verantwortlich ist, obwohl Main (1960) es aus Schafsserum anreichern und seine spaltende Wirkung nachweisen konnte, weitgehend unbekannt ist.

Die Autoren selbst untersuchten die fermentative Hydrolyse von E 600 und Armin (O-Äthyl-O-p-Nitrophenyl-äthyl-phosphat) durch menschliches Serum. Sie verwandten defibriniertes Blut gesunder Erwachsener innerhalb 24 Stunden nach Blutentnahme. Als Substrate dienten 7,5 mM Parathion und 7,5 mM Armin, als Puffer 25 mM Tris-HCl (pH=7,0). Die Hydrolyse lief bei 37°C über 15 Minuten. Das freigesetzte p-Nitrophenol wurde mit einem Gemisch aus Toluol und n-Butanol extrahiert. Kurz vor dem Messen wurde der Extrakt mit Äthanol-Ammoniak versetzt und die Extinktion bei 420 nm (p-Nitrophenol-Ammonium) festgestellt.

Da in der Mehrzahl der Fälle Paraoxon schneller als Armin hydrolytisch gespalten wurde, während eine Mischung der Serumweißfraktionen IV-1 und V eine wesentlich schnellere Spaltung des Armins zeigte, kamen die Autoren zu dem Ergebnis, daß die Nativ-

seren ein Enzym mit bevorzugter Paraoxonaseaktivität beinhalten.

Auch Krisch (1968) beschrieb, daß menschliches Serum E 600 in einer Konzentration von 10^{-4} M fermentativ spaltet. Mit seinen Untersuchungen versuchte er eine nähere Charakterisierung dieser Enzymaktivität. Das pH-Optimum seiner Reaktion lag im stark alkalischen Bereich etwa bei pH 11,2 . Er verwandte Seren von 25 Männern und ebensovielen weiblichen Versuchspersonen und erhielt Paraoxon-spaltende Aktivitäten von 38-190 μ Mol p-Nitrophenol pro Minute und Liter Serum. Es fielen dabei zwei sich überlagernde Gruppen auf , welche sich durch den Wert der Esteraseaktivität unterschieden. Die Aktivität derselben Versuchsperson schwankte nur innerhalb enger Grenzen. Veränderungen der Enzymaktivität unter pathologischen Bedingungen (bei Diabetes mellitus, Leukämie, Plasmozytom, Anämien, Herzinfarkt, Urämie Carzinomen, usw.) ergaben sich nicht , sodaß sich die Hoffnungen , die enzymatische Diagnostik bereichern zu können, nicht erfüllt haben.

Dagegen hält es Krisch (1968) auf Grund seiner Ergebnisse für möglich, daß die Aktivitätsunterschiede genetisch bedingt sind. Allerdings war eine genaue Zuordnung der einzelnen Versuchspersonen zu einer der beiden Gruppen wegen der Überlagerungen nicht immer sicher möglich.

Geldmacher von Mallinckrodt, Lindorf und Rabast (1959) stellten nach Inkubation menschlicher Serumcholinesterasen mit E 600 unterschiedliche Vergiftungsgrade des Enzyms durch den Hemmstoff fest. Sie fanden nach der Inkubation von 75 menschlichen Seren mit $3,2 \times 10^{-8}$ M E 600 eine Aufteilung in 3 Gruppen mit niedriger, mittlerer und hoher Cholinesteraserestaktivität.

Die Unterschiede konnten durch einen Polymorphismus der Serumcholinesterasen bedingt sein, aber auch durch einen Polymorphismus des E 600-spaltenden Fermentes. In letzterem Falle könnten genetisch bedingte Unterschiede in der Aktivität der Paraoxonase während des Ablaufes der Cholinesterasehemmung die E 600-Konzentration so variieren, daß unterschiedliche Cholinesteraseaktivitäten verbleiben. Die Cholinesterase könnte dann als Indikatorsystem für verbleibende E 600-Konzentrationen und die jeweilige Paraoxonaseaktivität dienen.

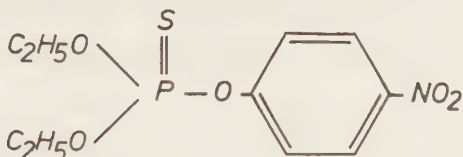
Geldmacher von Mallinckrodt, Baumgartner, Petenyi, Burgis, Lindorf und Metzner untersuchten den Zusammenhang zwischen dem fermentativen E 600-Abbau und der Vergiftung der Cholinesterase durch E 600 im menschlichen Serum. Personen, die niedrige Cholinesteraseaktivitäten aufwiesen, besaßen auch nach dem Verfahren von Krisch eine niedrige E 600-spaltende Aktivität. Versuchspersonen mit mittlerer Cholinesteraseaktivität zeigten mittlere bis hohe Paraoxonaseaktivitäten. Das Gleiche galt für Probanden mit hoher Cholinesteraseaktivität. Der errech-

nete Korrelationskoeffizient war $r = 0,82$.

In der vorliegenden Arbeit werden Untersuchungen darüber angestellt, wie sich die Paraoxon-spaltenden Aktivitäten menschlicher Seren unter standardisierten Bedingungen verhalten und welche Zusammenhänge zwischen der fermentativen Spaltung von Paraoxon, Methyl-Paraoxon, Parathion und Methyl-parathion bestehen.

Die Aktivität des hydrolysierenden Prinzips wurde nach der von Krisch (1968) angegebenen Methode im menschlichen Serum gemessen.

C) Beschreibung der verwendeten Substrate



PARATHION

$C_{10}H_{14}O_5NSP$

M 291,27

O,O-Diäthyl-O-p-Nitrophenyl-thiophosphat

Der Wirkstoff Parathion wurde 1944 von Schrader hergestellt. Er liegt heute hinsichtlich der produzierten Menge an der Spitze der insektiziden Phosphorsäureester.

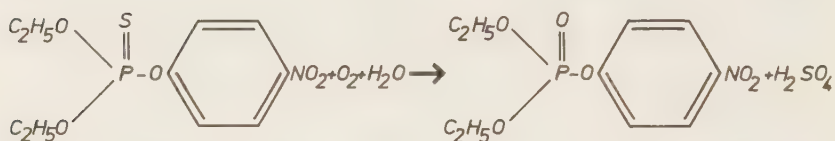
Physikalische Eigenschaften:

E 605 ist eine gelbbraune, lauchartig riechende Flüssigkeit. Es löst sich in den meisten organischen Lösungsmitteln. Die Wasserlöslichkeit beträgt bei 25°C 24 mg/l. Parathion ist in neutraler bis saurer Lösung gegen hydrolytische Einflüsse recht beständig, in alkalischem Milieu wird es dagegen in kurzer Zeit verseift.

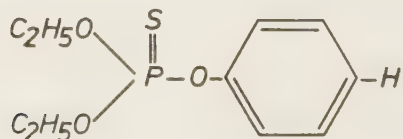
Chemische Eigenschaften:

Durch Oxydationsmittel wird Parathion leicht unter Bildung von Schwefelsäure in den analogen Phosphorsäureester (O,O-Diäthyl-O-p-Nitrophenyl-phosphat) übergeführt.

So verläuft im menschlichen Organismus oder in vitro , unter dem Einfluß von Fermenten , folgender Vorgang:



Parathion bzw. sein Oxydationsprodukt Paraoxon wirkt hemmend auf verschiedene Fermentsysteme (Quecke 1954). Die Hemmung ist als Phosphorylierung bestimmter Zentren (OH-,NH₂-gruppen) von Enzymen aufzufassen. Wird im Parathionmolekül die Nitrogruppe durch Wasserstoff ersetzt,dann resultiert daraus eine Verbindung , welche nicht mehr die Eigenschaft hat,phosphorylierend auf Fermente zu wirken (Schrader 1956). Der Verbindung kommen dann nur noch die Eigenschaften eines untoxischen Triesters der Thiophosphorsäure zu.



Toxische Eigenschaften:

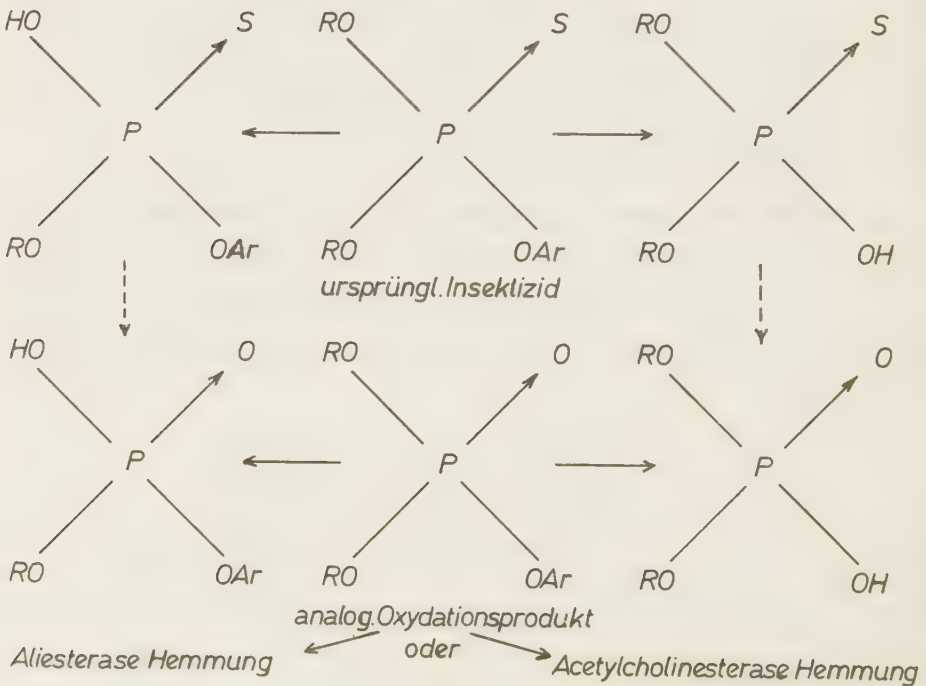
Bei der universellen Verbreitung des Pflanzenschutzmittels Parathion kamen durch unsachgemäße Handhabung Unglücksfälle vor. Das Präparat wurde daraufhin genau auf seine toxischen Eigenschaften hin untersucht.

Die eingehendsten Tierversuche sind in den pharmakologischen Instituten der Bayer-Werke angestellt worden. Je nach verwendeter Versuchstierart und Form der Applikation wurden für den Menschen Mengen von 0,45 bis 2,8 g reinen Wirkstoffes als Dosis letalis errechnet. Für die Bestimmung der Dosis letalis bei Kindern empfiehlt es sich, den Wert von 15-16,4 mg pro kg Körpergewicht anzusetzen (Hecht und Wirth 1954). Bei cutaner Applikation sollen Vergiftungserscheinungen erst bei der 10-fachen Dosis zu beobachten sein.

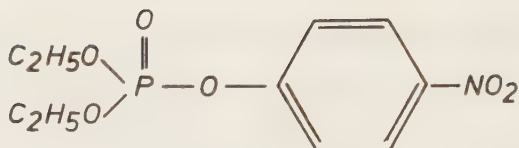
Bei Untersuchungen der Parathionwirkung auf Insekten zeigten Flapp und Casida (1958) eine starke Temperaturabhängigkeit auf. Bei niedrigen Temperaturen wirkte E 605 langsam, bei steigenden Temperaturen wurde die insektizide Wirkung erheblich beschleunigt.

Die Oxydation von Parathion in der Leber von Ratten zu Para-oxon wurde mit P^{32} -markierten Präparaten festgestellt (Neal 1967, Nakatsugawa und Dahm 1967)

Gestützt auf die Arbeiten von Neal (1967) , Nakatsugawa und Dahm (1967) gibt Murphy (1968) folgendes allgemeine Schema für den Metabolismus von Di-Alkyl-Aryl-Phosphorthionaten an:



An zahlreichen Vergiftungsfällen wurde die Spaltung von E 605 im menschlichen Organismus beobachtet : Deussen 1954 ,Enders 1953 ,Völksen 1953 . Bei Aufnahme subletaler und letaler Parationmengen läßt sich p-Nitrophenol im Urin nachweisen (Fischer und Klingelhöller 1961) . Bei Anwendung exakter Analysemethoden lassen sich diese kleinen Mengen p-Nitrophenol erfassen und damit schnell Vergiftungen nachweisen (Geldmacher von Malinckrodt und Deinzer 1966).



PARAOXON

$C_{10}H_{14}O_6NP$

M 275,19

O,O-Diäthyl-O-p-Nitrophenyl-Phosphat

Das 1944 von Schrader hergestellte E 600 besitzt ausgezeichnete insektizide und akarizide Wirkung. Die hohe Warmblütertoxizität von Paraoxon zog der praktischen Anwendung als Systeminsektizid enge Grenzen.

Paraoxon wird als Mioticum und Antiglaucomatosum unter der Bezeichnung "Mintacol" in der augenärztlichen Praxis verwendet. Über die Pharmakologie dieses Stoffes berichtet besonders Wirth (1952) .

Physikalische Eigenschaften:

E 600 ist in reinem Zustand ein farbloses , kaum riechendes Öl. In den meisten organischen Lösungsmitteln ist es leicht löslich. In Wasser lösen sich bei 25°C 2,4 g/l . Über die Hydrolysedaten von Paraoxon bei verschiedenen Temperaturen und pH-Werten berichtet Schrader (1963) :

50 % ige Verseifung in Tagen (pH 1-5)

10	20	30	40	50	60	70
1200	320	93	28	8,6	3,2	1,2

50 % ige Verseifung in Stunden bei 70°C

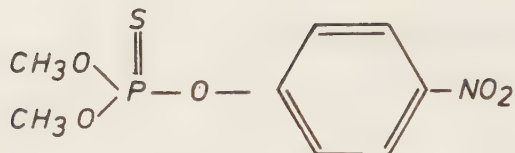
1	2	3	4	5	6	7	8	9	pH
18,5	22,7	23	24,4	24,4	18	11,5	9,2	2,1	Std

Chemische Eigenschaften:

Aus der oben angeführten Tabelle läßt sich ersehen , daß Paraoxon gegen hydrolytische Einflüsse relativ beständig ist. Interessant ist die Abhängigkeit der Hydrolysegeschwindigkeit im alkalischen Milieu von der Länge der am Phosphor gebundenen Alkoxygruppen. Es zeigt sich , daß unter gleichen Bedingungen Paraoxonpräparate mit längeren bzw. verzweigten Alkoholresten schwerer verseift werden können, als entsprechende lineare Verbindungen.

Toxische Eigenschaften:

Paraoxon ist für den Warmblüterorganismus außergewöhnlich stark toxisch. Der Ester wirkt auf verschiedene Fermentsysteme stark hemmend. Der Cholinesterasehemmwert liegt zum Beispiel bei $10^{-7,3}$ M für die 50 % ige Cholinesterasehemmung.



METHYL-PARATHION

$C_8H_{10}O_5NSP$

M 263,21

O,O-Dimethyl-O-p-Nitrophenyl-thiophosphat

Methyl-Parathion wurde 1944 von Schrader synthetisiert. Der Wirkstoff ist für Warmblüterorganismen weniger toxisch als Parathion. Die insektizide Wirkung kann hingegen hinsichtlich der Breite mit der von E 605 verglichen werden.

Physikalische Eigenschaften:

Der reine Wirkstoff ist ein weißes , kristallines Pulver.

In Wasser lösen sich bei 25°C 55mg/l. In den meisten organischen Lösungsmitteln ist der Ester leicht löslich. Gegen hydrolytische Einflüsse ist Methyl-Parathion weniger beständig als Parathion. Die hydrolytische Spaltung wurde von Mühlmann und Schrader 1957 bei verschiedenen Temperaturen und pH-Werten untersucht.

50 % ige Verseifung im alkalischen Milieu bei 80°C

Methyl-Parathion

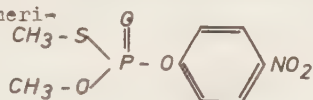
5 Minuten

Parathion

25 Minuten

Chemische Eigenschaften:

Charakteristisch ist die Eigenschaft des Methyl-E 605, bei erhöhter Temperatur schnell zum O,S-Dimethyl-O-p-Nitrophenylphosphat zu isomerisieren.



Da diese Verbindung sehr labil ist, entstehen leicht Folgereaktionen, die so schnell ablaufen, daß ein plötzlicher Zerfall des Moleküls eintreten kann.

Toxische Eigenschaften:

Methyl-Parathion ist weniger toxisch als die entsprechende Äthylverbindung Parathion.

Schrader (1961) gibt als Cholinesterasehemmwerte für beide Verbindungen an:

50 % ige Cholinesterasehemmung

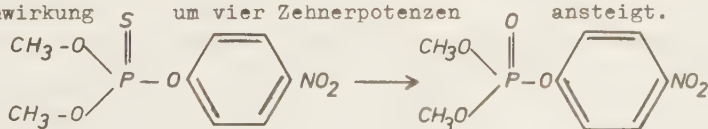
Methyl-Parathion

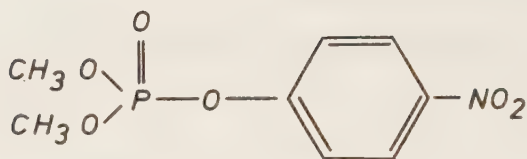
$$1 \times 10^{-4} \text{ M}$$

Parathion

$$1,2 \times 10^{-6} \text{ M}$$

Im Warmblüterorganismus wird Methyl-Parathion enzymatisch zur entsprechenden P=O Verbindung oxydiert, wodurch die Cholinesterasehemmwirkung um vier Zehnerpotenzen ansteigt.





METHYL-PARAOXON

$C_8H_{10}O_6NP$

M 247,13

O,O-Dimethyl-O-p-Nitrophenyl-phosphat

Bei einem Vergleich der Cholinesterasehemmwerte von Paraoxon und Methyl-Paraoxon bestimmte Schrader (1961) folgende Werte:

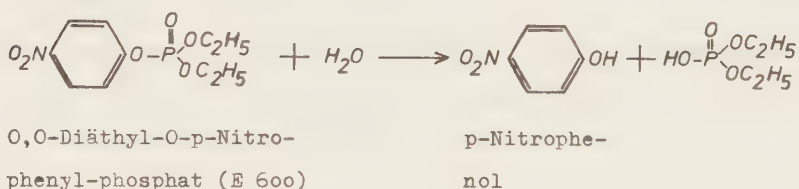
50 % ige Cholinesterasehemmung

Methyl-Paraoxon	$10^{-6,8}$	M
Paraoxon	$10^{-7,9}$	M

EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN

Prinzip des Verfahrens nach Krisch:

Setzt man einer wässrigen Lösung von Paraoxon Serum zu, so tritt eine sich rasch vertiefende Gelbfärbung auf. Durch enzymatische Hydrolyse wird dabei nach folgender Gleichung p-Nitrophenol freigesetzt:



Das freigesetzte p-Nitrophenol , das bei 405 nm im kontinuierlichen photometrischen Test direkt in der Küvette bestimmt werden kann, dient als Meßgröße.

In der vorliegenden Arbeit wird über die enzymatische Hydrolyse von O,O-Diäthyl-O-p-Nitrophenyl-phosphat (E 600) , O,O-Diäthyl-O-p-Nitrophenyl-phosphat (Methyl-E 600) , O,O-Diäthyl-O-p-Nitrophenyl-thiophosphat (E 605) und O,O-Dimethyl-O-p-Nitrophenyl-thiophosphat (Methyl-E 605) durch menschliches Serum in vitro berichtet.

Methodik (nach Krisch 1968)

Die Blutproben werden mit einer Kanüle entnommen , zentrifugiert und das Serum abgetrennt. Mit dem Serum eines Probanden werden jeweils 3 Messungen innerhalb von 24 Stunden nach Blutentnahme durchgeführt. Die in der statistischen Berechnung verwendeten Werte stellen Mittelwerte aus den 3 Messergebnissen dar.

1) Lösungen

0,1 m Glycin-Natronlauge-Puffer pH 11,2

E 600-Stammlösung: $1,2 \times 10^{-2}$ m E 600 in 0,1 m Trispuffer pH 8,0

Methyl-E 600-Stammlösung: $1,2 \times 10^{-2}$ m Methyl-E 600 in 0,1 m Trispuffer pH 8,0

E 605-Stammlösung: $1,2 \times 10^{-2}$ m E 605 in 0,1 m Trispuffer pH 8,0

Methyl-E 605-Stammlösung: $1,2 \times 10^{-2}$ m Methyl-E 605 in 0,1 m Trispuffer pH 8,0

Die Stammlösungen wurden zum Gebrauch 1:5 mit destilliertem Wasser verdünnt.

0,9 % ige Kochsalzlösung

Serum: 1:5 mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt

2) Ansatz

In ein Reagenzglas werden pipettiert:

1,65 ml Puffer pH 11,2 + 0,50 ml E 600-Lösung + 0,25 ml verdünntes Serum.

Ebenso wird mit der Methyl-E 600, der E 605- und der Methyl-E 605-Lösung verfahren.

3) Messung

Nach der Zugabe und Mischung wird die Lösung in eine Durchflußküvette gefüllt (Schichtdicke 1 cm) und die Extinktionszunahme bei 405 nm im selbstregistrierenden Spektralphotometer (Modell DK 2 der Firma Beckman Instruments) abgelesen. Es werden die Werte genau 60, 90, 120, 150, 180 Sekunden nach Zufügen der Serumverdünnung registriert.

Unsere Messtemperatur liegt konstant bei 25°C, da die Durchflußküvette während des Meßvorganges ein ständiges Umspülen der Lösung mit Wasser von 25°C Temperatur ermöglicht. Auch die vorbereiteten Lösungen wurden in einem Wasserbad auf diese Temperatur gebracht.

Vor jeder Messung der enzymatischen Hydrolyse (mit Serum) wird der Leerwert (ohne Serum) zur Erfassung der Eigenhydrolyse des Substrates bestimmt und vor Berechnung der Enzymaktivität abgezogen.

4) Berechnung

Ausgewertet wird nach Krisch die Extinktionsdifferenz:

$$E_{180 \text{ sec}} \text{ minus } E_{30 \text{ sec}}$$

Zur Umrechnung der Extinktionsdifferenzen in nMol abgespaltenes p-Nitrophenol wird der molare Extinktionskoeffizient von p-Nitrophenol (in Glyzin-Natronlaugepuffer pH 11,2 bei 405 nm = $18,05 \times 10^6 \text{ cm}^2 \text{ Mol}^{-1}$) zugrunde gelegt. 10 nMol p-Nitrophenol gelöst in 1 ml hätten demnach bei $d=1 \text{ cm}$ und $\lambda=405 \text{ nm}$ eine Extinktion von 0,1805. Unter weiterer Berücksichtigung der Serumverdünnung (Umrechnung auf 1 ml Serum durch Multiplikation mit 20) der Meßzeit (Umrechnung auf 1 Minute durch Division mit 2,5) und des Ansatzvolumens (2,4 ml, Multiplikation mit 2,4) errechnet sich die Aktivität (in $\text{nMol Min}^{-1} \text{ l}^{-1}$ Serum) nach folgender Formel:

$$\text{Aktivität} = \frac{E \times 10 \times 2,4 \times 20}{0,1805 \times 2,5} = E \times 1063 \text{ (U/l Serum)}$$

Da wir in unserer Versuchsreihe aus praktischen Gründen die Extinktionsdifferenzen von der 60. bis 180. Sekunde bestimmt haben, ergab sich für uns folgende Veränderung der Formel:

$$\text{Aktivität} = \frac{E \times 10 \times 2,4 \times 20}{0,1805 \times 2} = E \times 1329 \text{ (U/l Serum)}$$

D) Eigene Untersuchungen

Ergebnisse und statistische Auswertung

Zuerst wurde die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit vom pH-Wert gemessen. Ausgewählt wurde der pH-Bereich zwischen pH 8,8 - pH 12,4 .

Die Tabellen 1-4 zeigen diese Abhängigkeit der enzymatischen Hydrolyse von Paraoxon, Methyl-Paraoxon, Parathion und Methyl-Parathion durch Humanserum in 0,1 M Glyzin-Natronlauge-Puffer bei konstanter Temperatur von 25°C . Obwohl sich, wie Vorversuche zeigten , für die Substrat-leerwerte (ohne Serum) bis zu pH 12,0 nur sehr niedrige Extinktionsdifferenzen im Vergleich zu den Vollwerten (mit Serum) registrieren ließen, wurde auch die nichtenzymatische Hydrolyse für den Bereich pH 8,8 - pH 12,4 bestimmt und rechnerisch bei der Ermittlung der Enzymaktivitäten berücksichtigt.

Die gefundenen Ergebnisse sind in den Abbildungen 5-7 graphisch dargestellt.

pH	Extinktion (ohne Serum)	$\mu\text{Mol/Min l}$	Extinktion (mit Serum)	$\mu\text{Mol/Min l}$
8,8	o	o	o,11	146
9,2	o	o	o,12	159
9,6	o	o	o,15	199
10,0	o	o	o,16	212
10,4	o,001	o,133	o,165	219
10,8	o,004	o,532	o,175	231
11,2	o,01	1,33	o,175	231
11,6	o,02	2,66	o,11	146
12,0	o,04	5,32	o,08	107
12,4	o,075	9,97	o,03	40

Das pH-Optimum der enzymatischen Hydrolyse von Paraoxon durch Humanserum in 0,1 M Glyzin-Natronlauge-Puffer liegt im Bereich zwischen pH 10,8 - pH 11,2 .

Alle in der Arbeit beschriebenen Versuche wurden deshalb , wie bei Krisch (1968), im genannten Puffer bei pH 11,2 durchgeföhrt.

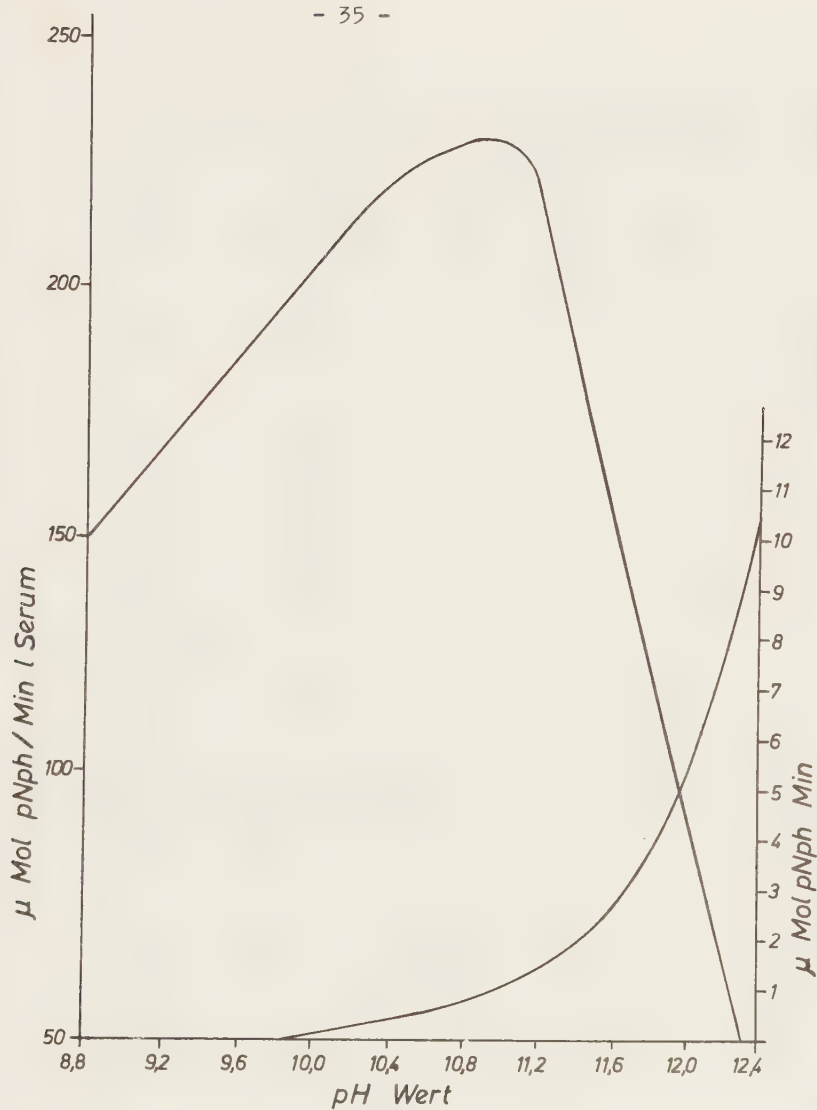


Abbildung 5

Darstellung der enzymatischen und nichtenzymatischen Spaltung von E 600

Abhängigkeit der nichtenzymatischen und enzymatischen Spaltung von Methyl-Paraoxon vom pH-Wert:

pH	Extinktion (ohne Serum)	$\mu\text{Mol/Min l}$	Extinktion (mit Serum)	$\mu\text{Mol/Min l}$
8,8	0	0	0,08	106,5
9,2	0	0	0,09	119
9,6	0	0	0,1	133
10,0	0,001	0,133	0,135	179
10,4	0,005	0,665	0,15	199
10,8	0,01	1,33	0,16	212
11,2	0,02	2,66	0,18	238
11,6	0,03	3,99	0,18	238
12,0	0,06	7,98	0,12	159
12,4	0,095	12,6	0,05	66,5

Das pH-Optimum der enzymatischen Hydrolyse von Methyl-Paraoxon durch Humanserum in 0,1 M Glyzin-Natronlauge-Puffer liegt im pH-Bereich zwischen pH 11,2 - 11,6 .

Alle weiteren in der Arbeit beschriebenen Versuche wurden im genannten Puffer bei pH 11,2 ausgeführt.

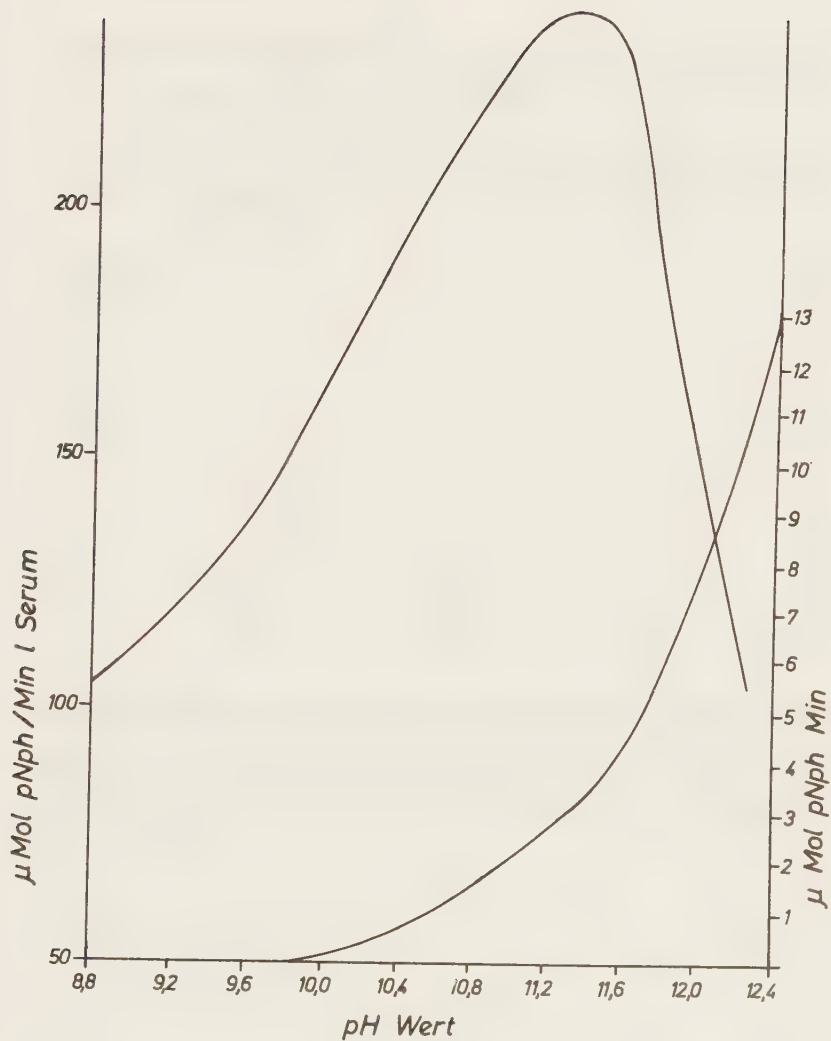


Abbildung 6

Darstellung der enzymatischen und nichtenzymatischen Spaltung von Methyl-E 600 .

Abhängigkeit der enzymatischen und nichtenzymatischen Spaltung von Parathion vom pH-Wert:

pH	Extinktion (ohne Serum)	$\mu\text{Mol/Min l}$	Extinktion (mit Serum)	$\mu\text{Mol/Min l}$
8,8	o	o	o	o
9,2	o	o	o	o
9,6	o	o	o	o
10,0	o	o	o	o
10,4	o	o	o	o
10,8	o	o	o	o
11,2	o	o	o	o
11,6	0,001	0,133	o	o
12,0	0,002	0,266	o	o
12,4	0,906	0,798	o	o

Parathion zeigte in vitro keine meßbare enzymatische Hydrolyse durch Humanserum. Im stark alkalischen Milieu (pH 11,6 - 12,4) zeigte sich eine schwache nichtenzymatische Spaltung.

Abhängigkeit der enzymatischen und nichtenzymatischen Spaltung von Methyl-Parathion vom pH-Wert:

pH	Extinktion (ohne Serum)	µMol/Min l	Extinktion (mit Serum)	µMol/Min l
8,8	o	o	o	o
9,2	o	o	o	o
9,6	o	o	o	o
10,0	o	o	o	o
10,4	o	o	o	o
10,8	0,001	0,133	o	o
11,2	0,002	0,266	o	o
11,6	0,004	0,532	o	o
12,0	0,008	1,064	o	o
12,4	0,01	1,33	o	o

Methyl-Parathion zeigte in vitro keine meßbare enzymatische Hydrolyse durch Humanserum. Im stark alkalischen Bereich (pH 10,8 - 12,4) zeigte sich eine schwache nichtenzymatische Spaltung.

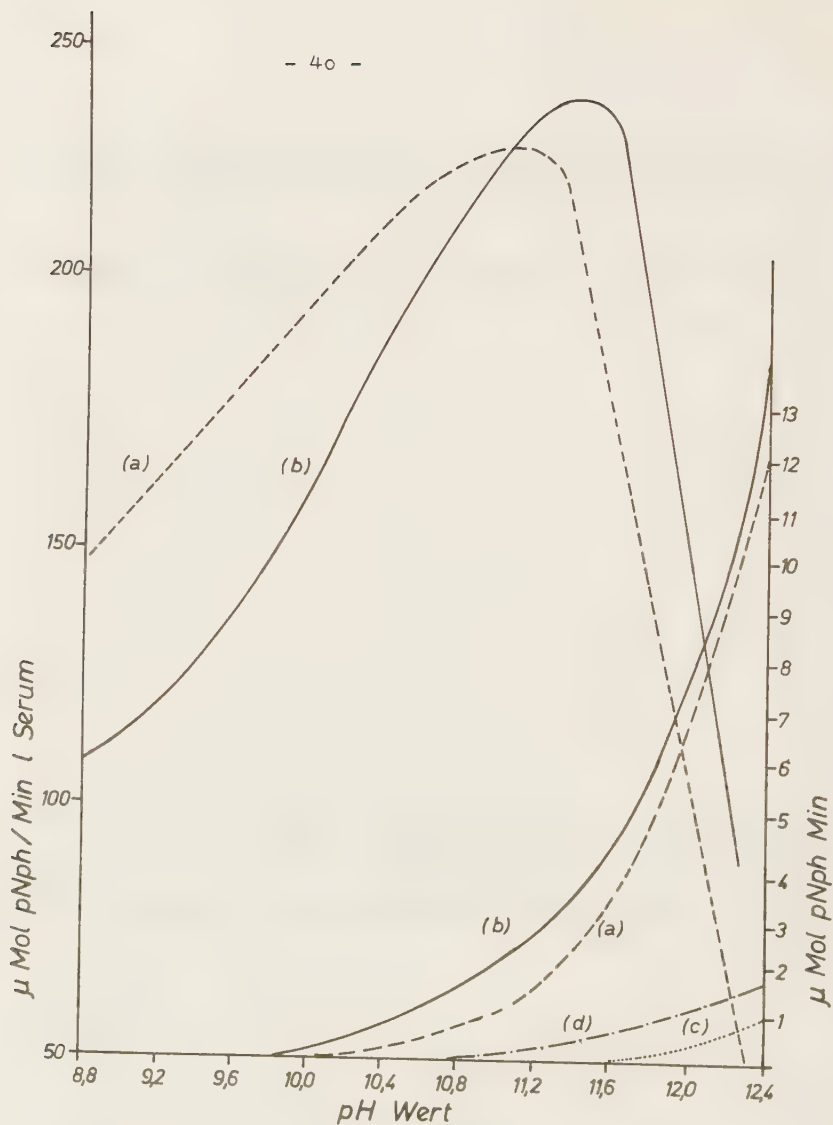


Abbildung 7

Darstellung der enzymatischen und nichtenzymatischen Hydrolyse von Paraoxon (a) , Methyl-Paraoxon (b) , sowie der nichtenzymatischen Spaltung von Parathion (c) und Methyl-Parathion (d) .

Bei den 30 von uns untersuchten Probanden handelte es sich um gesunde Personen im Alter von 17 - 72 Jahren. 15 von ihnen waren männlichen, die anderen weiblichen Geschlechts.

In Tabelle I sind für diese 30 Versuchspersonen gemessenen Paraoxonase-Aktivitäten im Serum aufgeführt und nach steigender Aktivität geordnet.

Versuchspers.	Geschlecht	Extinktion (60-180 sec)	U/l
Vp 8	♂	0,038	51
Vp 4	♂	0,0399	53
Vp 11	♀	0,044	58
Vp 7	♀	0,0465	62
Vp 10	♀	0,0475	63
Vp 12	♀	0,0835	111
Merk1.	♂	0,0845	112
Vp 1	♀	0,088	117
Geldm.M	♀	0,094	125
Vp 2	♂	0,098	130
Opitz	♂	0,10	133
Vp 9	♂	0,108	144
Vp 5	♀	0,115	153
Vp 6	♀	0,116	154
Vp 3	♀	0,123	164

Mei.U	♀	0,159	212
Burg.	♂	0,164	218
Mei.Ulr	♂	0,168	223
Flottw.	♀	0,1865	248
Ötting.	♂	0,19	253
Geldm.D	♂	0,208	276
Geldm.J	♂	0,209	278
Mei.S	♀	0,215	281
Mei.V	♂	0,224	289
Reinh.	♂	0,229	305
Schei.Mu	♀	0,229	305
Kittel	♀	0,23	306
Mei.Mu	♀	0,247	325
Machb.	♂	0,276	369
Geldm.H	♂	0,323	433

Die für 30 Probanden ermittelten und in Tabelle I zusammengestellten Paraoxonase-Aktivitäten sind in Abbildung 8 graphisch dargestellt.

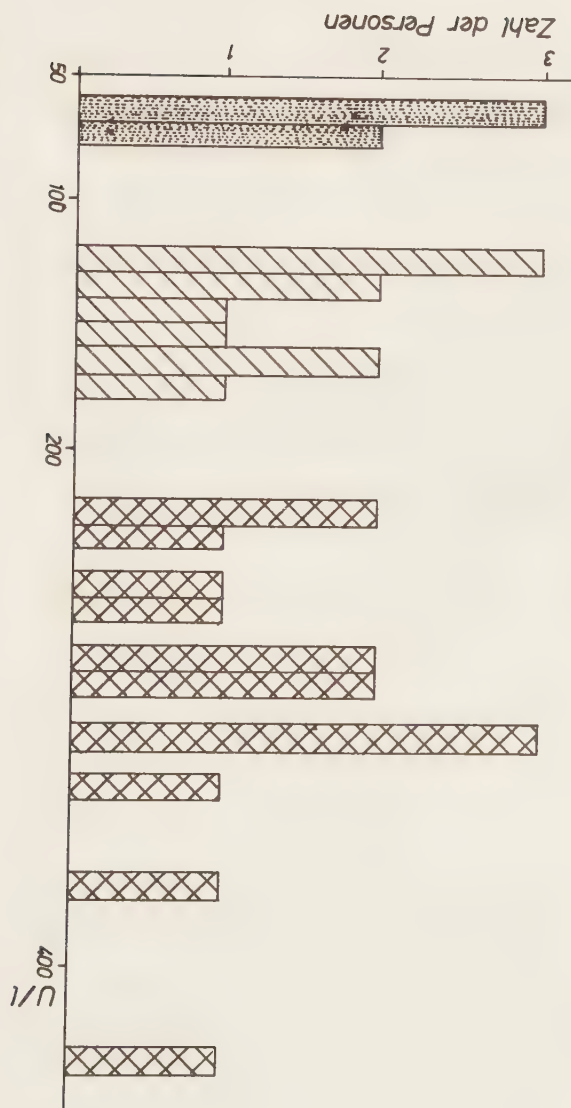


Abbildung 8

Paraoxonase-Aktivitäten für 30 Versuchspersonen für E 600

Krisch (1968) hat die von ihm gemessenen Werte für die Paraoxonase-Aktivitäten bei je 25 gesunden Frauen und Männern , welche eine Zufallsauswahl darstellten , in ein Wahrscheinlichkeitsnetz eingetragen.

Es ergab sich eine normallogarithmische Verteilung der Werte mit 2 Maxima von Häufigkeiten.

Die graphische Darstellung der von Krisch (1968) erhaltenen Werte für die Paraoxonase-Aktivitäten im Serum von 50 Versuchspersonen im Wahrscheinlichkeitsnetz (Abszisse logarithmisch , Ordinate nach dem Gausschen Integral geteilt) zeigt die folgende Abbildung 9 .

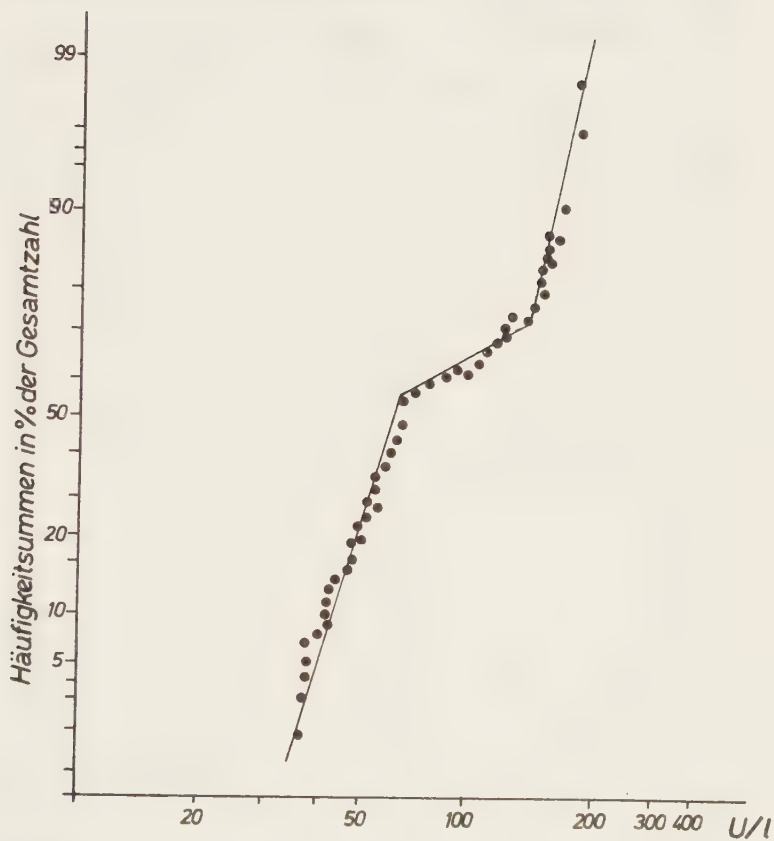


Abbildung 9

Paraoxonase-Aktivitäten im Serum von 50 Versuchspersonen
im Wahrscheinlichkeitsnetz dargestellt (nach Krisch 1968)

Zur Berechnung der Summenhäufigkeiten, der in Tabelle I angegebenen Paraaxonase-Aktivitäten in 30 Probandenserum, wurde Tabelle II angefertigt.

Tabelle II

Paraaxonase-Aktivität für E 600	Massenmitte	Frequenz	%	Summenhäufigkeit
51 - 61	55	3	10	10
61 - 70	65	2	6,7	16,7
111-120	115	3	10	26,7
121-130	125	2	6,7	33,4
131-140	135	1	3,3	36,7
141-150	145	1	3,3	40
151-160	155	2	6,7	46,7
161-170	165	1	3,3	50
211-220	215	2	6,7	56,7
221-230	225	1	3,3	60
241-250	245	1	3,3	63,3
251-260	255	1	3,3	66,6
271-280	275	2	6,7	73,3
281-290	285	2	6,7	80
301-310	305	3	10	90
321-330	325	1	3,3	93,3
361-370	365	1	3,3	96,6
431-440	435	1	3,3	99,9

Die in den Seren unserer 30 Versuchspersonen gemessenen Paraoxonase-Aktivitäten für E 600 wurden in ein Wahrscheinlichkeitsnetz eingetragen und in der Abbildung 10 graphisch dargestellt. (Abszisse im Wahrscheinlichkeitsnetz logarithmisch , Ordinate nach dem Gausschen Integral geteilt)

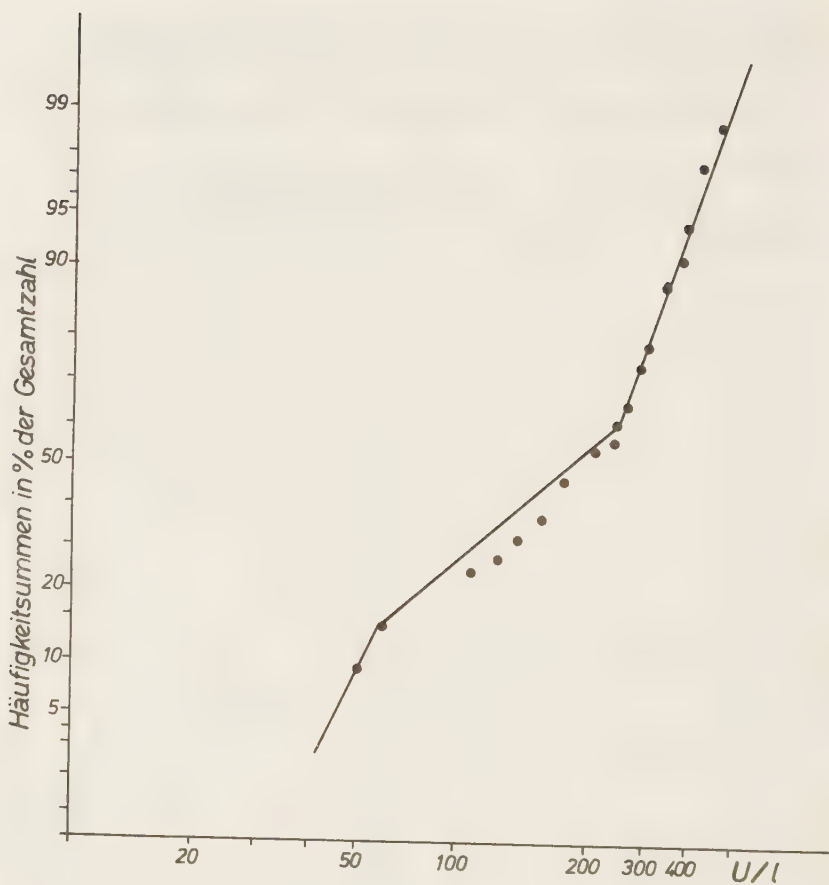


Abbildung 10

Paraoxonase-Aktivitäten im Serum unserer 30 Versuchspersonen
im Wahrscheinlichkeitsnetz dargestellt.

Mit den Seren derselben 30 Versuchspersonen wurde die Spaltung von Methyl-E 600 im Serum bestimmt. Die gemessenen Werte sind, nach steigenden Aktivitäten geordnet, in Tabelle III angeführt.

Tabelle III

Versuchspers.	Geschlecht	Extinktion (60-180 sec)	U/1
Vp 10	♀	0,0375	50
Vp 4	♂	0,038	51
Vp 11	♀	0,042	56
Vp 8	♂	0,0488	65
Vp 7	♀	0,0548	73
Vp 1	♀	0,0754	100
Vp 12	♀	0,0775	103
Merk1.	♂	0,0845	112
Geld.M	♀	0,0904	120
Opitz	♂	0,0955	127
Vp 9	♂	0,1045	139
Vp 2	♂	0,1105	147
Vp 5	♀	0,111	148
Vp 6	♀	0,113	150
Vp 3	♀	0,118	157

Burg.	♂	0,138	183
Mei.Ulr	♂	0,151	203
Flottw.	♀	0,158	210
Mei.U	♀	0,1585	211
Mei.S	♀	0,177	235
Ötting.	♂	0,189	251
Geld.J	♂	0,194	258
Mei.Mu	♀	0,204	272
Geld.D	♂	0,206	274
Mei.V.	♂	0,21	280
Reinh.	♂	0,218	290
Kittel	♀	0,2285	304
Schei.Mu	♀	0,238	316
Machb.	♂	0,251	334
Geld.H	♂	0,318	424

Die für unsere 30 Versuchspersonen ermittelten und in Tabelle III zusammengestellten Paraoxonase-Aktivitäten mit Methyl-Paraoxon als Substrat sind in Abbildung 11 graphisch dargestellt.

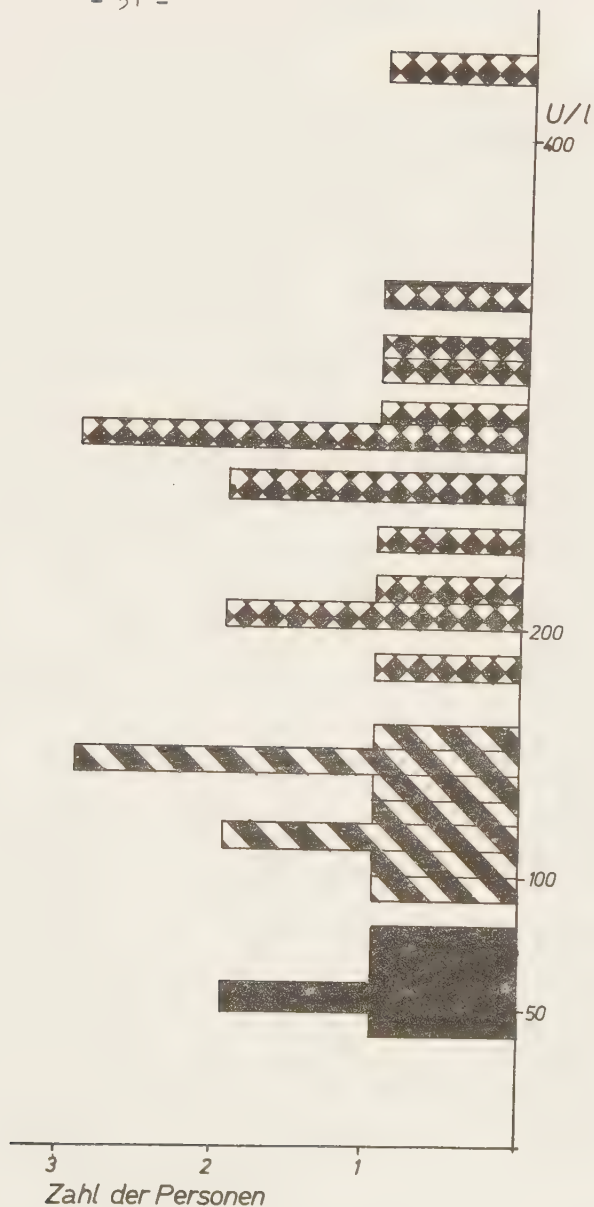


Abbildung 11

Paraoxonase-Aktivitäten für 30 Versuchspersonen mit Methyl-E 600

Zur Berechnung der Summenhäufigkeiten der in Tabelle III angegebenen Paraoxonase-Aktivitäten für das Substrat Methyl-E 600 wurde Tabelle IV angefertigt.

Tabelle IV

Paraoxonase-Aktivität für Methyl-E 600	Massenmitte	Frequenz	%	Summenhäufigkeit
41 - 50	45	1	3,3	3,3
51 - 60	55	2	6,7	10
61 - 70	65	1	3,3	13,3
71 - 80	75	1	3,3	16,6
91 -100	95	1	3,3	19,9
101-110	105	1	3,3	23,2
111-120	115	2	6,7	29,9
121-130	125	1	3,3	33,2
131-140	135	1	3,3	36,5
141-150	145	3	10	46,5
151-160	155	1	3,3	49,8
181-190	185	1	3,3	53,1
201-210	205	2	6,7	59,8
211-220	215	1	3,3	63,1
231-240	235	1	3,3	66,4
251-260	255	2	6,7	73,1
271-280	275	3	10	83,1

281-290	285	1	3,3	86,4
301-310	305	1	3,3	89,7
311-320	315	1	3,3	93
331-340	335	1	3,3	96,3
421-430	425	1	3,3	99,6

Die von uns in 30 Probandenseren gemessenen Paraoxonase-Aktivitäten bei Verwendung von Methyl-E 600 als Substrat , wurden in Abbildung 12 im Wahrscheinlichkeitsnetz aufgetragen.

(Abszisse logarithmisch , Ordinate im Gausschen Integral geteilt)

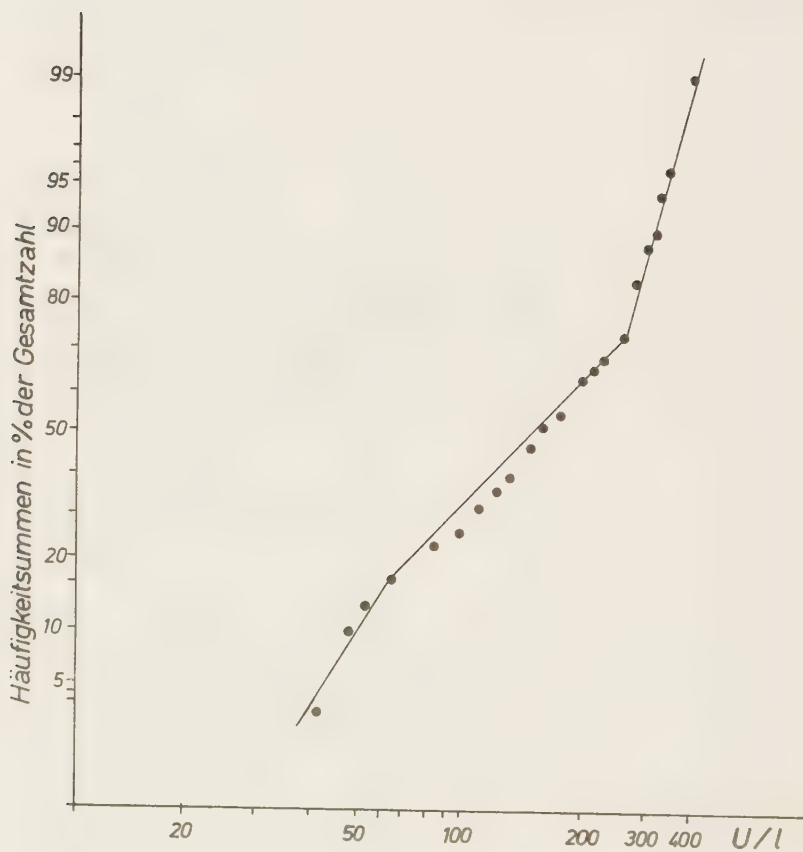


Abbildung 12

Paraoxonase-Aktivitäten von 30 Probandenseren mit Methyl-E 600 als Substrat im Wahrscheinlichkeitsnetz dargestellt.

Um den Grad des Zusammenhanges zwischen fermentativer Hydrolyse von Paraoxon und Methyl-Paraoxon zu erfassen, wurde der Korrelationskoeffizient für die, an jeweils den gleichen 30 Probanden bestimmten Werte der Paraoxonase-Aktivität bei Verwendung von E 600 und Methyl-E 600 als Substrat errechnet.

In Tabelle V sind diese ,für 30 Versuchspersonen ermittelten Werte,einander gegenüber gestellt.

Tabelle V

Versuchspers.	Geschlecht	Paraoxonase-Akt. (Substrat E 600)	Paraoxonase-Akt. (Substrat M-E 600)
Vp 8	♂	51	65
Vp 4	♂	53	51
Vp 11	♀	58	56
Vp 7	♀	62	73
Vp 10	♀	63	50
Vp 12	♀	111	103
Merk1.	♂	112	112
Vp 1	♀	117	100
Geld.M	♀	125	120
Vp 2	♂	130	147
Opitz	♂	133	127
Vp 9	♂	144	139
Vp 5	♀	153	148
Vp 6	♀	154	150
Vp 3	♀	164	157

Mei.Ulr	♂	212	203
Burg.	♂	218	183
Mei.U	♀	223	211
Flottw.	♀	248	210
Ötting.	♂	253	251
Geld.D	♂	276	274
Geld.J	♂	278	258
Mei.S	♀	281	235
Mei.V	♂	289	280
Reinh.	♂	305	290
Schei.Mu	♀	305	316
Kittel	♀	306	304
Mei.Mu	♀	325	272
Machb.	♂	369	334
Geld.H	♂	433	424

Die Berechnung des Korrelationskoeffizienten erfolgte nach der in der Statistik gebräuchlichen Pearson-Formel:

$$r = \frac{\sum (x - M_x) (y - M_y)}{\sqrt{\sum (x - M_x)^2 \sum (y - M_y)^2}}$$

Beim Vergleich der Werte der Paraoxonase-Aktivitäten mit E 600 und Methyl-E 600 als Substrate errechnete sich ,unter Verwendung der oben angeführten Formel, ein Korrelationskoeffizient von

$$r = 0,965$$

In Abbildung 13 sind die in Tabelle V einander gegenübergestellten Werte, in ein Koordinatensystem eingetragen. Auf der Ordinate sind die Paraoxonase-Aktivitäten für das Substrat M-E 600, auf der Abszisse die für das Substrat E 600 aufgetragen.

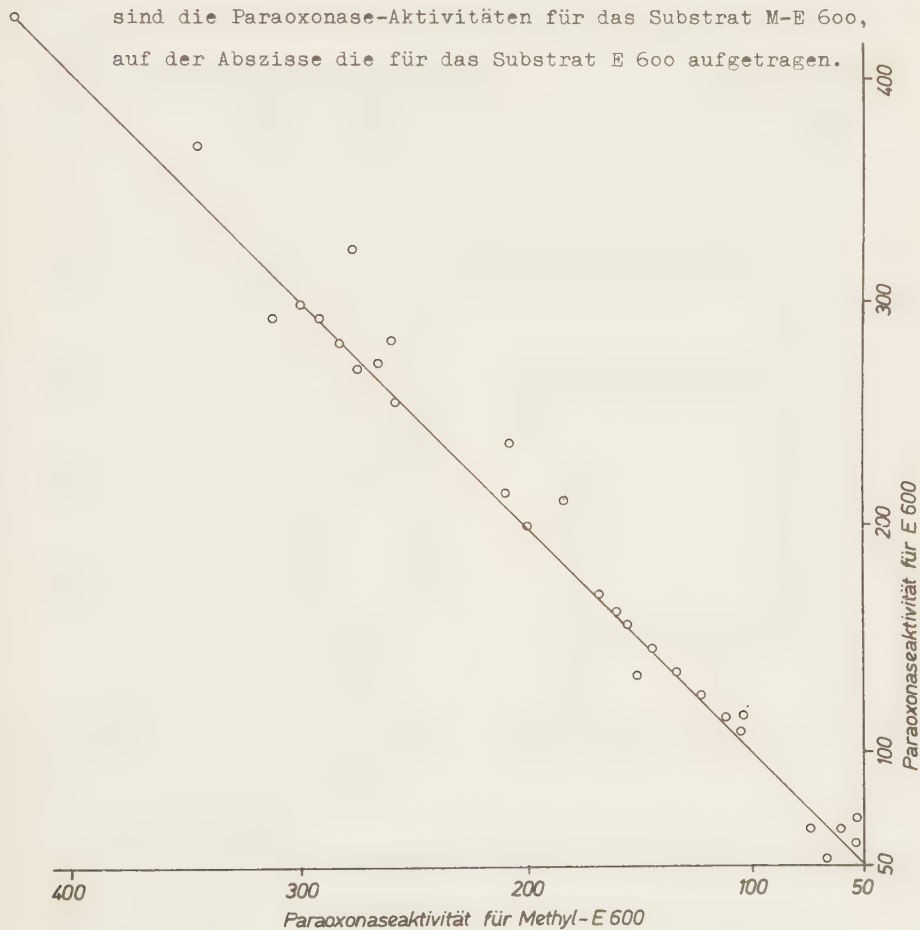


Abbildung 13

Zur Bestimmung der Präzision des in der Methodik angegebenen Testes führten wir eine 10-fach-Messung des gleichen Serums (Serum Burgis) durch. Es ergaben sich folgende Werte:

Extinktion (60-180 sec)	Paraoxonase-Aktivität für das Substrat E 600
0,163	217
0,158	210
0,157	209
0,164	218
0,156	208
0,164	218
0,158	210
0,156	208
0,163	217
0,158	210

$$\text{Mittelwert: } m = \frac{\sum x}{n}, \quad m = 212,5$$

$$\text{Streubreite der Einzelwerte: } s = \sqrt{\frac{\sum \Delta x^2}{n - 1}}, \quad s = 4,36 \text{ U/l},$$

$$\text{Fehler: } f = \frac{s}{m}, \quad f = 2\%,$$

Das Ergebnis zeigt, daß der methodische Fehler im Vergleich zur individuellen biologischen Streuung der Aktivitäten äußerst gering ist.

Da Krisch (1968) bei der Prüfung der Stabilität der Paraoxonase-Aktivitäten an 2 verschiedenen Seren über einen Zeitraum von 35 Tagen besonders bei der Versuchsperson mit hoher Aktivität erhebliche Schwankungen angibt (zwischen 175 $\mu\text{Mol pNph/Min l Serum}$ und 225 $\mu\text{Mol pNph / Min l Serum}$), untersuchten wir die Reproduzierbarkeit der individuellen Aktivitäten über einen Zeitraum von 16 Wochen. Wir wählten dazu 3 Probanden aus und bestimmten in etwa 2 wöchigen Abständen ihre Paraoxonase-Aktivitäten im Serum mit E 600 als Substrat. Es wurden folgende Werte gemessen:

Versuchspers.	Extinktion	Paraoxonase-Aktivität für das Substrat E 600
	(60-180 sec)	
Vp 11	0,045	59,5
	0,044	58
	0,0415	55,5
	0,045	59,5
	0,0425	56,5
	0,044	58
	0,0445	59
	0,045	59,5

Mittelwert: $m = 58,2$,

Streubreite der Einzelwerte: $s = 1,65 \mu\text{Mol pNph/ Min l Serum}$

Streuung: 2,8 %

Opitz	0,102	136
	0,101	134
	0,095	127

0,100	133
0,098	131
0,106	141
0,104	139
0,107	142

Mittelwert: $m = 135,4$,

Streubreite der Einzelwerte: $s = 5,15 \mu\text{Mol pNph/ Min l Serum}$

Streuung: 3,8 %

Burg.	0,167	222
	0,158	210
	0,151	201
	0,164	218
	0,156	208
	0,160	212
	0,157	209
	0,156	208

Mittelwert: $m = 211$,

Streubreite der Einzelwerte: $s = 6,47 \mu\text{Mol pNph/ Min l Serum}$

Streuung: 3 %

Die für unsere 3 Versuchspersonen gemessenen Schwankungen in der Paraoxonase-Aktivität über den Zeitraum von 16 Wochen , sind in Abbildung 14 aufgezeichnet.

Man kann daraus erkennen, daß die jeweilige Aktivität nur innerhalb sehr enger Grenzen schwankt. Die angegebenen Werte sind also individuell fixierte und gut reproduzierbare Größen und keine zufälligen, zum Beispiel durch methodische Fehler bedingte Schwankungen.

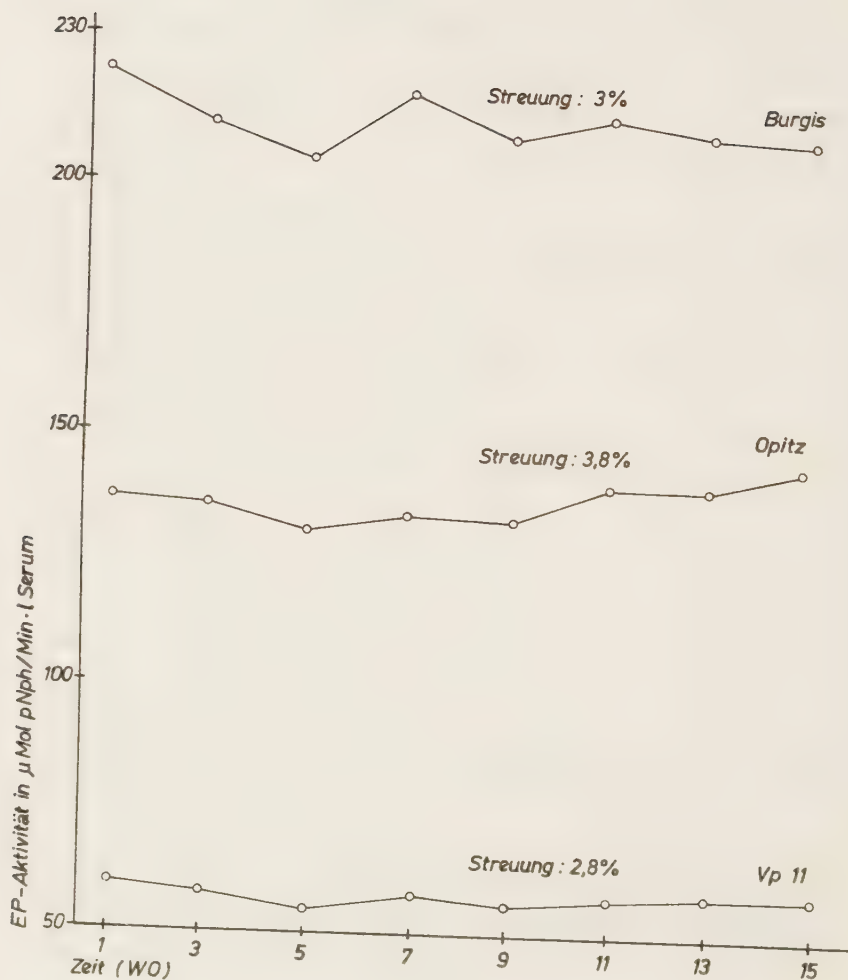


Abbildung 14

Schwankungen der Paraoxonase-Aktivitäten über den Zeitraum von 16 Wochen für 3 Versuchspersonen mit E 600 als Substrat

E) Diskussion und Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde das enzymatische Hydrolysevermögen menschlicher Blutseren gegenüber den Verbindungen Parathion, Methyl-Parathion, Paraaxon und Methyl-Paraaxon untersucht.

Die Abbildungen 5-7 zeigen die pH-Abhängigkeit der Hydrolyse dieser Organophosphorverbindungen ohne Zusatz von menschlichem Serum und die fermentative Spaltung nach Zusatz von Serum. Die Bestimmungen erfolgten in 0,1 M Glyzin-Natronlauge-Puffer .

Während die nichtenzymatische Spaltung mit zunehmendem pH-Wert pro Zeiteinheit ansteigt, liegt das Optimum der enzymatischen Spaltung für Paraaxon und Methyl-Paraaxon im stark alkalischen Bereich zwischen pH 11,2 und 11,6 . Die weiteren Untersuchungen wurden deshalb in 0,1 M Glyzin-Natronlauge-Puffer durchgeführt.

Die nicht-enzymatische Hydrolyse stieg für alle 4 gewählten Verbindungen erst ab pH 12,0 stark an. Die Substratleerwerte wurden trotzdem bei der Ermittlung der Aktivitäten rechnerisch berücksichtigt.

Die Thioverbindungen (Parathion und Methyl-Parathion) waren neben der durch das stark alkalische Milieu der verwendeten Pufferlösungen bedingten Spontanhydrolyse keiner fermentativen Hydrolyseaktivität ausgesetzt.

Die Verbindungen Paraoxon und Methyl-Paraoxon als P=O -
-Analoge zeigten dagegen, daß sie durch ein Enzymsystem
im menschlichen Serum hydrolytisch gespalten werden. Hier-
mit ist erneut bewiesen, daß im menschlichen Serum Enzyme
vorhanden sind, welche die Alkyl-Aryl-Phosphorsäureester
an der Anhydridbindung aufspalten, solange an der Phosphor-
säuregruppe der Sauerstoff nicht durch Schwefel ersetzt
ist.

Die Tatsache, daß die Abspaltung von p-Nitrophenol aus den
Thionoverbindungen bei Zugabe von menschlichem Serum nur
in der Größenordnung der spontanen Hydrolyse im alkalischen
Milieu lag, läßt andererseits jedoch noch nicht die sichere
Folgerung zu, daß es keine Serumenzyme gibt, welche Thiophos-
phorsäureester dieser Art spalten, denn es ist denkbar, daß
das stark alkalische Milieu diese Enzyme hemmt oder zerstört.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden mit 30 verschiedenen
Humanseren die Paraoxonase-Aktivitäten bei Zusatz von E 600
und Methyl-E 600 untersucht.

Wie aus der nach steigenden Aktivitäten geordneten Werte-
tabelle ersichtlich ist, ergaben sich für Paraoxon Aktivi-
täten von 51-433 $\mu\text{Mol p-Nitrophenol/Min l Serum}$ und für
Methyl-Paraoxon von 50-424 $\mu\text{Mol p-Nitrophenol/Min l Serum}$.

Um den Grad des Zusammenhanges zwischen beiden Meßreihen
genau zu erfassen, wurde der Korrelationskoeffizient berech-

net . Er betrug nach der Pearsonformel: $r = 0,965$;
Es läßt sich auf Grund dieses Ergebnisses mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit die Aussage treffen, daß Paraoxon und Methyl-Paraoxon vom gleichen Enzymsystem hydrolysiert werden. Die Substitution der Äthylgruppen im Molekül des Paraoxon (o,o-Diäthyl-o-p-Nitrophenyl-Phosphat) hat dabei auf das enzymatische Hydrolyseverhalten der Paraoxonase offensichtlich keinen Einfluß.

In Anknüpfung an die Arbeiten von Krisch (1968) , Geldmacher-von Mallinckrodt und Lindorf (1969) , Geldmacher-von Mallinckrodt, Lindorf und Rabast (1969) und Geldmacher-von Mallinckrodt und Baumgartner (1970) wurde im weiteren Verlauf der Untersuchungen versucht, die Spezifität des Enzymsystems zu erhellen.

Mit 30 verschiedenen Humanseren und den Substraten Paraoxon und Methyl-Paraoxon ließen sich jeweils 3 Aktivitätsgruppen, welche allerdings eine gewisse Streuung aufweisen , finden. In den Abbildungen 8 und 11 ist dieser Befund graphisch dargestellt.

Dieses Ergebnis stützt die von Geldmacher-von Mallinckrodt, Rabast und Lindorf (1969) aufgestellte Theorie eines Polymorphismus des Paraoxon-spaltenden Enzyms.

Für die Streuungen innerhalb der einzelnen Aktivitätsgruppen sind verschiedene Faktoren in Erwägung zu ziehen:

- 1) Es könnten von der Zeit abhängige Aktivitätsschwankungen von Einzelpersonen vorliegen.
- 2) Es sind die Möglichkeiten für Meßungenauigkeit zu prüfen, welche im Untersuchungsverfahren begründet liegen.
- 3) Bestimmte Ionen könnten als Inhibitoren oder Aktivatoren des wirksamen Enzymsystems Einfluß ausüben (Krisch 1968 , Cier 1969)
- 4) Es könnten unterschiedliche Proteinabsorptionen des Serums vorliegen (Schaumann und Schiller 1960) .

Wir prüften zunächst inwieweit individuelle Aktivitäten über die Zeit reproduzierbar sind:

Die Enzymaktivitäten von 3 Versuchspersonen wurden über den Zeitraum von 4 Monaten für das Substrat Paraoxon mit ihren Schwankungen aufgezeichnet.

Wie aus der graphischen Darstellung (Abb.14) und den rechnerisch ermittelten Abweichungsbreiten von 2,8 % , 3,8 % und 3,0 % hervorgeht, unterliegen die jeweiligen Aktivitäten nur geringen Schwankungen. Die Werte dürfen als individuell fixierte und gut reproduzierbare Größen bezeichnet werden.

Um eine Aussage über die Präzision des angewandten Meßverfahrens machen zu können, wurde an einem Tag eine fortlaufende 10-fache Bestimmung der Aktivität eines Serums (Serum Burgis) durchgeführt.

Der methodische Fehler fällt bei konstant gehaltenen Versuchsbedingungen kaum ins Gewicht. Die errechnete Abweichungsbreite von 2 % ist im Vergleich zur individuellen biologischen Streuung sehr gering.

Die von uns für 30 Humanseren ermittelten Enzymaktivitäten der Paraoxon und Methy-Paraoxon-Hydrolyse liegen im Bereich von 51-433 und 50-424 $\mu\text{Mol p-Nitrophenol/Min l Serum}$. Dabei lassen sich jeweils 2 Häufungen um 100 und etwa 270 $\mu\text{Mol p-Nitrophenol/Min l Serum}$ feststellen.

Trägt man diese Werte in ein Wahrscheinlichkeitsnetz ein (Abb 10 und Abb 12), so stellt sich in etwa eine Doppelgipfligkeit dar.

Für das Zustandekommen der unterschiedlichen Enzymaktivitäten bieten sich folgende 2 Möglichkeiten zur Diskussion an:

Liegt ein einziges Enzymprotein vor, welches die untersuchten Verbindungen Paraoxon und Methyl-Paraoxon aufspaltet, so könnte man die unterschiedlichen Aktivitäten rein quantitativ erklären.

Schließt man sich der heute überwiegend vertretenen Ansicht an, daß es sich um ein Enzymsystem handelt, so muß eine spezifische Enzymgruppe, die sich aus einzelnen Isoenzymen zusammensetzt, zu Grunde liegen - eine Modellvorstellung, wie sie zum Beispiel auch für die Enzymstruktur der Serumcholinesterasen entwickelt wurde (LaMotta und Woronick 1971).

Diese Auffassung von einem Enzymsystem ist in der Literatur bereits mehrfach zu finden. So konnten Erdös und Boggs (1961), sowie Skrinjaric-Spoljar (1968) zwei Enzyme anreichern, welche sich in der Fraktion IV-1 und in der Albuminfraktion V fanden.

F) Literatur

1. Aldridge, W.N.

Serum esterases. 1. Two types of esterase (a and b) hydrolysing p-nitrophenyl-acetate, propionate and butyrate, and a method for their determination
Biochem. J. 53, 110 (1953 a)

2. Aldridge, W.N.

Serum esterases. 2. An enzyme hydrolysing diethyl-p-nitrophenyl-phosphate (E 600) and its identity with the A-esterase of mammalian sera
Biochem. J. 53, 117 (1953)

3. Augustinsson, K.B. and Heimbürger, G.

The enzymatic hydrolysis of organophosphorus compounds
Biochem. Biophys. Acta 13, 303 (1954 a)

4. Augustinsson, K.B. and Heimbürger, G.

Enzymatic hydrolysis of organophosphorus compounds
I. Occurrence of enzymes hydrolysing dimethylamidoethoxy-phosphoryl cyanide (Tabun)
Acta chem. Scand. 8, 753 (1954 b)

5. Augustinsson, K.B. and Heimbürger, G.

Enzymatic hydrolysis of organophosphorus compounds
II. Analysis of reaction products in experiments with Tabun and some properties of blood plasma tabunase
Acta chem. Scand. 8, 762 (1954 c)

6. Augustinsson, K.B. and Heimbürger, G.
Enzymatic hydrolysis of organophosphorus compounds
V. Effect of phosphorylphosphatase on the inactivation of cholinesterase by organophosphorus compounds in vitro
Acta. chem. Scand. 9 , 310 (1955 a)
7. Augustinsson, K.B. and Heimbürger, G.
Enzymatic hydrolysis of organophosphorus compounds
VI. Effects of metallic ions on the phosphorylphosphatases of human serum and swine kidney
Acta chem. Scand. 9 , 383 (1955 b)
8. Cier, A.
Reactivation of cholinesterase inhibited by organophosphates activity of oximes and metal ions alone and in combination
Bull. Soc. Chim. Biol. 51 , 753 (1969)
9. Davison, A.N. and Aldridge, W.N.
Mechanism of inhibition of cholinesterases by organophosphorus compounds
Biochim. J. 55 , 763 (1953)
10. Erdős, E.G. and Boggs, L.E.
Hydrolysis of paraoxon in mammalian blood
Nature 190 , 716 (1961)

11. Friedberg, K.D. und Erdmann, W.D.
Spontane Reaktivierung der durch Alkylphosphate
(Paraoxon, Systox, Isosystox) blockierten Cholinester-
ase in vitro
Naunyns Schmiedebergs Arch. exp. Path. u. Pharm. 237, 1 (1959)
12. Geldmacher-v. Mallinckrodt, M. und Lindorf, H.
Unterschiedliche Reaktion menschlicher Serumcholin-
esterasen mit Alkylphosphaten
Vortrag auf der 48. Tagung der Deutschen Gesellschaft
für Rechtsmedizin in Berlin 6.-9.10.1969
13. Geldmacher-v. Mallinckrodt, M., Lindorf, H. und Rabast, U.
Unterschiedliche Reaktion menschlicher Serumcholinester-
asen mit E 600 (O,O Diäthyl-O-nitrophenylphosphat)
Arch. Toxokol. 25, 223 (1969)
14. Geldmacher-v. Mallinckrodt, M. und Deinzer, K.
Schnellreaktion auf p-Nitrophenol im Harn zum Nach-
weis einer E 605 -Vergiftung
Z. klin. Chem. u. klin. Biochem. 4, 81 (1966)
15. Kling, T.G.
Blood cholinesterase activity in previously stressed
animals subjected to parathion
J. Occup. Med. 11, 82 (1969)
16. Krisch, K.
Enzymatische Hydrolyse von E 600 durch menschliches
Serum
Z. klin. Chem. u. klin. Biochem. 6, 41 (1968)

17. La Motta ,R.V. and Woronick,Ch.L.
Molecular heterogeneity of human serum cholinesterase
Clin.Chem.17 ,135 (1971)
18. Main,A.R.
The purification of the enzyme hydrolysing diethyl-
-p-nitrophenylphosphate (paraoxon) in sheep serum
Biochim.J. 74 ,10 (1960)
19. Murphy,S.D.
Mechanism of pesticide interactions in vertebrates
Residue Rev. 25 , 201 (1969)
20. Nakatsugawa,T.and Dahm,P.A.
Microsomal metabolism of parathion
Biochem.Pharmacol. 10 ,391 (1967)
21. Neal,R.A.
Studies on the metabolism of diethyl-4-nitrophenyl-
phosphorothionate (parathion) in vitro
Biochem.J. 103 ,183 (1967)
22. Quecke,K.
Das Präparat E 605
Marburg/L Düstri-Verlag (1954)

23. Rider, A. and Moeller, H.C.
Toxicity of parathion, systox, octamethyl-pyrophosphoramide and methyl-parathion in man
Toxic.Appl.Pharm. 14 ,603 (1969)
24. Schaumann, W. und Schiller, M.
Inaktivierung von Alkylphosphaten im Gehirn und im Serum
Arch.exptl. Pathol.Pharmakol. 239 ,114 (1960)
25. Schrader, G.
Die Entwicklung neuer insektizider Phosphorsäureester
Verlag Chemie GmbH
Weinheim/Bergstraße 1963
26. Skrinjaric-Spoljar, M. and Reiner, E.
Hydrolysis of diethyl-p-nitrophenylphosphate and ethyl-p-nitrophenylethylphosphate by human sera
Biochim.Biophys.Acta 165 ,289 (1968)
27. Wagner-Jauregg, Th.
Modellreaktionen phosphorhaltiger Enzym-Inaktivatoren
Arzneimittel-Forschung 4 , 527 (1954)

Zum Schluß der Arbeit erlaube ich mir , Herrn Prof.Dr.Dr. E.Weinig ,Direktor des Institutes für Rechtsmedizin der Universität Erlangen-Nürnberg,für die Arbeitsmöglichkeit in seinem Institut , die stets freundliche Unterstützung und die Übernahme des Koreferates , meinen besten Dank auszusprechen.

Frau Prof.Dr.Dr. Geldmacher-v. Mallinckrodt gilt mein besonderer Dank für die Überlassung des Themas und ihre vielfältigen und wertvollen Anregungen bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Herrn Dr.D.Lorke , Leiter des Institutes für Toxikologie der Farbenfabriken Bayer AG,bin ich für die Überlassung von reinem E 600,Methyl-E600,E 605 und Methyl-E 605 verpflichtet.

L e b e n s l a u f

Am 25. September 1945 wurde ich , Heinz Burgis , als Sohn des Bundesbahnbeamten Max Burgis und seiner Ehefrau Rosa , geb. Karl , in Burgellern/Bamberg geboren. Ich besuchte die Luitpoldschule und die Oberrealschule in Bamberg , wo ich 1964 die Reifeprüfung ablegte.

Von 1964 bis 1966 leistete ich in einer Sanitätseinheit Wehrdienst.

Das Studium der Medizin begann ich im Wintersemester 66/67 an der Universität Erlangen-Nürnberg . Den vorklinischen Teil schloß ich im Februar 1969 mit dem Physikum ab. Das Staatsexamen der Medizin beendete ich am 31. Juli 1972 an der Universität Erlangen-Nürnberg.



